Beiträge zur Kenntnis der α-Aminobuttersäure. Derivate der Pyrrolidoncarbonsäure.

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

DER

HOHEN PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT

DER

VEREINIGTEN FRIEDRICHS-UNIVERSITÄT

HALLE-WITTENBERG

ACAD. LUGD BAT. BIBL.

VORGELEGT VON

Erich Wurm

aus Berlin.

Halle a. S. 1913.

Tag der mündlichen Prüfung: **17. Februar 1913.**

Referent:

Prof. Dr. **Vorländer.**

Verlagsdruckerei Merkur, Berlin S.O. 16.

Meinen lieben Eltern.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544727_0120

Stoffeinteilung.

Theoretischer Teil:

I. Ueber Aminobuttersäure.

II. Ueber Pyrrolidoncarbonsäure.

Experimenteller Teil:

I. Ueber Aminobuttersäure.

Seite

A. Darstellung der α-Aminobuttersäure 19
1. Brombuttersäure 19
2. Aminobuttersäure 20
B. Partielle Vergärung der dl-Aminobuttersäure durch lebende Hefe 20
C. Fütterungsversuche am Kaninchen 22
1. dl-Amniobuttersäure 22
2. dl-Aminobutyryl-Glycin 22
D. Verhalten der α-Aminobuttersäure gegen rauchende Salzsäure 23
E. Spaltung der dl-α-Aminobuttersäure in die optisch aktiven Komponenten mittelst der Formylverbindung 24
1. Formyl-dl-α-Aminobuttersäure 24
2. Formyl-d-Aminobuttersäure 25
3. d-Aminobuttersäure 27
4. Formyl-l-Aminobuttersäure 27
5. l-Aminobuttersäure 28
6. Optische Verfolgung der Abspaltung der Formylgruppe aus der Formyl-l-Aminobuttersäure 28

II. Derivate der Pyrrolidoncarbonsäure.

A. Darstellung der dl-Pyrrolidoncarbonsäure . 30
B. Pyrrolidonylchlorid 30
C. Verhalten des Pyrrolidonylchlorids gegen Alkohole 30
1. Methylalkohol 30
2. Aethylalkohol 31
D. Pyrrolidonyl-Cholesterin 31
E. dl-Pyrrolidonyl-d-Alaninester 32
F. dl-Pyrrolidonyl-dl-Leucinester 34

Theoretischer Teil.

I. Ueber Aminobuttersäure.

In den meisten Proteinen übertreffen, wenigstens der Menge nach, die aliphatischen Monoaminosäuren alle anderen bedeutend. Mit Sicherheit nachgewiesen wurden bis jetzt Glykokoll, Alanin, Valin (α-Aminoisovaleriansäure), Leucin (α-Aminoisobutylessigsäure) und Isoleucin (α-Amino-β-Methyl-β-Aethylpropionsäure).

In dieser homologen Reihe fehlt merkwürdigerweise das Mittelglied, die α-Aminobuttersäure. Es ist bisher nicht gelungen, die Anwesenheit dieser Säure eindeutig nachzuweisen.

In der Literatur findet sich allerdings von Zeit zu Zeit eine dahingehende Angabe. So heißt es in einer Arbeit von Emil Fischer, P. A. Levene und R. H. Aders [1]) über die Hydrolyse des Leims, daß die von 55—80° übergehende Esterfraktion „vielleicht Aminovaleriansäure und Aminobuttersäure enthielt, die aber nicht in reinem Zustande isoliert werden konnten". Auch Schützenberger und Bourgeois [2]) geben als Spaltungsprodukt der Gelatine unter anderen Aminosäuren die Aminobuttersäure an.

Tatsächlich werden bei der fraktionierten Kristallisation der Gemische von Alanin, Valin und Leucin oft Fraktionen erhalten, deren Stickstoffgehalt auf Aminobuttersäure hinweist, doch ist es Abderhalden gelungen, diese Gemische zu zerlegen und somit darzutun, daß es sich hier keinesfalls um einheitliche Produkte gehandelt haben kann.

Fehlt somit noch durchaus der Nachweis, daß unsere Aminosäure einen Baustein der Proteine darstellt, so ist es andrerseits die Vermutung nicht von der Hand zu weisen, daß Aminobuttersäure trotzdem in einigen Eiweißkörpern vorkommt.

Die Ursache dieser Ungewissheit ist wohl darin zu suchen, daß über die Eigenschaften der Aminobuttersäure noch recht wenig bekannt ist.

Die Verbindung selbst ist schon von Friedel und Machuca [3]) und kurz vorher von R. Schneider [4]) gewonnen worden. Beide gingen von der gewöhnlichen Gärungsbuttersäure aus und bromierten sie mit elementarem Brom und rotem Phosphor als Halogenüberträger. Durch Erhitzen der Brombuttersäure mit wässerigem Ammoniak erhielten sie die Aminoverbindung:

$$CH_3.CH_2.CHBr.COOH+2NH_3 = CH_3.CH_2.CHNH_2.COOH+NH_4Br$$

Eine andere Synthese ist von N. Zelinsky und G. Stadnikoff [5]) durchgeführt worden. Sie liessen auf Propionaldehyd Cyankalium und Chlorammonium einwirken. Dabei findet folgender Vorgang statt:

$$CH_3.CH_2.CHO+NH_3+HCN = CH_3.CH_2.\underset{\diagdown\,NH_2}{\overset{/\,CN}{CH}}+H_2O$$

Durch Verseifung des Cyanhydrins kommt man dann zur Säure selbst:

$$CH_3.CH_2.\underset{\diagdown\,NH_2}{\overset{/\,CN}{CHO}}+2H_2O = CH_3.CH_2.CHNH_2.COOH+NH_3$$

Später hat dann Emil Fischer mit einigen seiner Schüler einige Derivate der α-Aminobuttersäure dargestellt. So führten E. Fischer und A. Mouneyrat [6]) die Spaltung der Razemform in die beiden optisch aktiven Komponenten durch. Sie verwandelten die Aminobuttersäure in die Benzoylverbindung. Aus der wässerigen Lösung des Morphinsalzes

kristallisierte die d-Verbindung aus. Aus der Mutterlauge wurde dann nach Abspaltung des Morphins und Ueberführung in das Brucinsalz in alkoholischer Lösung die l-Verbindung isoliert.

Das umständliche Verfahren und die schlechten Ausbeuten sind offenbar schuld, daß auch alle späteren Arbeiten sich ausschließlich mit der razemischen Aminobuttersäure befassen.

So stellte E. Fischer [7]) das salzsaure dl-α-Aminobutyrylchlorid dar, ohne aber dasselbe zu Kupplungen mit anderen Aminosäuren zu benutzen. Ferner beschreiben E. Fischer und K. Raske [8]) mehrere razemische Dipeptide der Aminobuttersäure.

Um nun eine genauere Kenntnis der Eigenschaften unserer Aminosäure zu erhalten, ist es nötig, davon möglichst zahlreiche optisch aktive Derivate darzustellen, und zwar besonders von derjenigen Form, die ihrer Configuration nach der natürlich vorkommenden entspricht.

Es war daher meine Aufgabe zunächst nachzuweisen, ob die d- oder die l-Aminobuttersäure als Baustein der Proteine in Betracht käme. Daran schlossen sich Versuche über das Verhalten der Aminobuttersäure im tierischen Organismus.

Sodann mußte eine Methode ausgearbeitet werden, die es gestattet, leicht und in guter Ausbeute die aktiven Formen zu erhalten. Endlich suchte ich den Einfluß der bei der Eiweißhydrolyse gebräuchlichen Operationen festzustellen, um eventuell daraus Schlüsse für die weiteren Nachforschungen zu ermöglichen.

Mit der Darstellung optisch aktiver Derivate hat sich dann besonders Hsing Lang Chang [9]) beschäftigt.

Bei der Darstellung der dl-α-Aminobuttersäure hielt ich mich an die Vorschrift von Fischer und Mouneyrat [6]). Doch wurde die Amidierung der Brombuttersäure stets bei Brutschranktemperatur vorgenommen.

Schon hier fiel mir die ziemlich lockere Bindung der Aminogruppe am übrigen Molekül auf. Wenn ich bei der

Auflösung der Brombuttersäure im Ammoniak nicht genau die im experimentellen Teil näher beschriebenen Vorsichtsmaßregeln beobachtete, so war die Ausbeute an der Aminoverbindung sehr gering, während in grosser Menge Oxybuttersäure auftrat.

Der Grund hierfür mag darin liegen, daß das organisch gebundene Brom, welches einen höheren Lösungsdruck besitzt als die Hydroxylionen des Ammoniumhydroxyds, bestrebt ist, in den ionisierten Zustand überzugehen, wobei dann einfach das Brom im Buttersäurerest durch die Hydroxylgruppe ersetzt wird*). Oberhalb einer gewissen Temperatur, die nach meinen Beobachtungen bei ca. 40° liegt, ist dieses Bestreben so gross, daß es die Substitution des Broms durch die Aminogruppe fast völlig verdrängt. In der Tat muß man, um eine gute Ausbeute an Aminobuttersäure zu erhalten, die Temperatur des Ammoniaks bei der Auflösung der Brombuttersäure durch starke Kühlung bei etwa 0° halten, da die Neutralisationswärme sehr gross ist. Beim Arbeiten ohne Kühlung erhitzt sich das Gemisch schnell fast auf Siedetemperatur, wobei die Umsetzung innerhalb sehr kurzer Zeit verläuft.

Zur Entscheidung der Frage nach der eventuell biologisch wichtigen Komponente der Aminobuttersäure benutzte ich die Methode der partiellen Vergärung von Aminosäuren durch lebende Hefe von Felix Ehrlich [10]) mit zwei kleinen Modifikationen. Erstens wurde die vergorene Flüssigkeit mit kolloidalem Eisenhydroxyd enteiweißt, was die weitere Verarbeitung wesentlich vereinfachte, zweitens wurde die übriggebliebene Komponente der Aminobuttersäure über den Ester isoliert.

Die Versuche ergaben mit aller Bestimmtheit, daß in erster Linie die d-Aminobuttersäure von den Hefefermenten zerstört wird. Die spezifische Drehung der zurückgebliebenen

---

*) Die Leichtigkeit mit der die Verseifung eintritt, wächst mit der Länge der normalen Kohlenstoffkette, wie Versuche mit Brompalmitinsäure beweisen, die bei Behandlung mit Ammoniak bereits bei Brutschranktemperatur fast völlig in die Oxyverbindung übergeht.

Komponente betrug — 5°. Hiermit steht auch im Einklang, daß nach den Untersuchungen von E. Abderhalden und H. L. Chang [9]) Dipeptide der d-Aminobuttersäure von Hefepreßsaft gespalten werden, während solche des optischen Antipoden unangegriffen bleiben. Demnach kann nur die d-Aminobuttersäure in der Natur vorhanden sein.

Mit dem Verhalten der Aminobuttersäure im tierischen Organismus beschäftigt sich eine Arbeit von E. Friedmann [11]): „Zur Kenntnis des Abbaues der Karbonsäuren im Tierkörper". Friedmann verfütterte z. B. 5 g Aminobuttersäure an Hunde, konnte aber im Harn mittelst β-Naphtalinsulfochlorid keine Spur der Aminosäure nachweisen.

Ich verfütterte dl-Aminobuttersäure an Kaninchen und versuchte im Harn die eventuell ausgeschiedene Aminosäure über den Ester zu isolieren. Es resultierte in einem Falle eine sehr geringe Menge des Esters; das Produkt zeigte Linksdrehung, war aber zur Identifizierung zu wenig. Auch bei der Verfütterung von dl-Aminobutyrylglycin ergab sich, daß weder im Harn noch im Kot Aminosäuren nachweisbar waren. Offenbar ist auch die l-Aminobuttersäure für Zellfermente leicht angreifbar.

Ueberhaupt ist die Aminobuttersäure kein sehr beständiger Körper. Unter allen im Eiweiß nachgewiesenen Aminosäuren ist es allein das Tryptophan, welches bei der Säurehydrolyse zerstört wird. Alle anderen dagegen erweisen sich gegenüber rauchender Salzsäure als recht resistent. Als ich aber Aminobuttersäure Operationen unterwarf, wie sie bei der Hydrolyse gebräuchlich sind, so ergab sich stets eine weitgehende Zerstörung. Bei sechsstündigem Kochen mit rauchender Salzsäure in einer der bei der Eiweißhydrolyse möglichst nahekommenden Konzentration wurden fast 13% des Gesamtstickstoffs als Ammoniak abgespalten. Unter genau gleichen Bedingungen wurden weder Alanin noch Leucin verändert. Auch bei der Veresterung der Aminobuttersäure wurden über 2% des Stickstoffs als Ammoniak frei. Dagegen erwies sich die Säure gegen siedende Natronlauge als völlig beständig.

Bei der Destillation unvorbehandelter Aminobuttersäure mit Natronlauge ging keine Spur Ammoniak über.

Die Spaltung der razemischen Aminobuttersäure in die beiden optisch aktiven Komponenten erfolgte nach der Methode, die zuerst Emil Fischer und Otto Warburg[12]) für das Leucin und dann R. Locquin[13]) für das Isoleucin angewandt hatten.

Demnach wurde die dl-Aminobuttersäure zunächst in die Formylverbindung übergeführt. Die Trennung erfolgte in alkoholischer Lösung mittelst der Brucinsalze; das Brucinsalz der Formyl-l-Aminobuttersäure kristallisierte dann aus.

Bei der Isolierung der aktiven freien Aminosäuren zeigte sich, daß die Formylgruppe nur sehr locker am Molekül haftet. Bereits beim Umkristallisieren aus Wasser sank die Drehung enorm. Es gelang, durch Destillation mit Wasserdampf die Formylgruppe fast quantitativ abzuspalten. Es war nötig, auf diese Weise die entstandene Ameisensäure stets gleich zu entfernen, da beim Kochen unter Rückfluss sich bald ein Gleichgewichtszustand bildet, der natürlich die Reaktion beendet. Bei der von mir benutzten Anordnung ist dagegen die Abspaltung fast vollkommen.

Der Reaktionsverlauf läßt sich sehr gut optisch verfolgen, wie eine im experimentellen Teil angegebene Tabelle zeigt. Im Laufe von 9 Stunden nahm die Drehung der Lösung (Formyl-l-Aminobuttersäure) von $+1{,}18^0$ bis $+0{,}09$ ab.

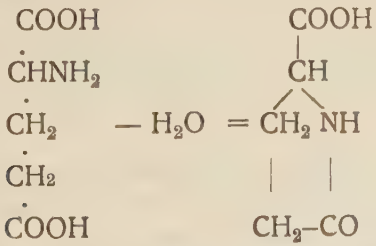
Da bei dieser Versuchsanordnung die aktiven Säuren in der Lösung rein zurückbleiben, und daraus durch blosses Eindampfen gewonnen werden können, wurde die Abspaltung der Formylgruppe stets auf diese Weise vorgenommen. Die spezifische Drehung der beiden Antipoden stimmte mit der von E. Fischer und A. Mouneyrat beobachteten sehr gut überein.

II. Ueber Pyrrolidoncarbonsäure.

Die Pyrrolidoncarbonsäure hat wegen ihrer nahen Beziehungen zur Glutaminsäure schon lange das Interesse der Chemiker erregt. Denn nicht nur die Glutaminsäure selbst, sondern viele ihrer Derivate, wie die Ester, spalten beim Erhitzen auf ca. 160° intramolekular Wasser resp. Alkohol ab, wobei sie in Pyrrolidoncarbonsäure oder deren entsprechende Derivate übergehen. Daher wurde diese Säure schon mehrmals unter den Spaltungsprodukten der Proteine gefunden. Die Art ihrer Gewinnung macht es sehr wahrscheinlich, daß sie sekundär entstanden war.

So fand Schützenberger[14]) bei der Zersetzung des Albumins durch wässerige Barytlösung unter Druck die von ihm als „Glutiminsäure" bezeichnete Pyrrolidoncarbonsäure (1875). Er gab bereits als Schmelzpunkt 180° an.

Die erste beabsichtigte Darstellung hat dann Ludwig Haitinger[15]) ausgeführt. Er benutzte bereits die noch heute übliche Methode, nämlich Erhitzen der Glutaminsäure auf 180—190°. Er nannte nach dieser Herstellungsweise die Säure Pyroglutaminsäure. Er versuchte auch eine Konstitutionsbestimmung. Bei starkem Erhitzen entstand nämlich Pyrrol in ziemlicher Menge, weshalb er im Molekül einen Pyrrolring annahm, was auch nach der Darstellung zu vermuten ist.



Demnach ist die Pyrrolidoncarbonsäure als das α-Ketoderivat eines in α-Stellung carboxylierten Pyrrolidins zu bezeichnen. Das Reduktionsprodukt der Säure, also die Pyrrolidin-α-carbonsäure, ist das in den meisten Proteinen nachgewiesene Prolin. Wegen dieser nahen Beziehungen

zwischen Glutaminsäure, Pyrrolidoncarbonsäure und Prolin ist die Ueberführbarkeit dieser Körper in einander von Interesse. E. Fischer und R. Böhner[16]) haben diese Verwandschaft vor kurzem durch das Experiment nachgewiesen. Sie veresterten Glutaminsäure, verwandelten den Ester durch Destillation in den Pyrrolidoncarbonsäure-Aethylester und reduzierten diesen in alkoholischer Lösung durch metallisches Natrium. Hierbei erhielten sie, wenn auch nur in geringer Menge, Prolin, welches sie als Kupfersalz isolierten. Hiermit war ein weiterer Beweis für die oben aufgestellte Konstitution der Pyrrolidoncarbonsäure erbracht.

Noch eine Reihe von Arbeiten beschäftigt sich mit dieser Säure.

Zunächst haben A. Menozzi und G. Appiani[17]) die physikalischen und kristallographischen Eigenschaften der Pyrrolidoncarbonsäure festgestellt und außerdem einige Derivate, Salze und das Amid, beschrieben. Später fanden E. Fischer und Th. Dörpinghaus[18]) bei der Hydrolyse des Horns in der von 155—195° übergehenden Esterfraktion neben Phenylalanin und Glutaminsäure auch die Pyrrolidoncarbonsäure, für die sie als Schmelzpunkt 147° angaben. Da die aktive Form bei ca. 150° schmilzt, müssen sie wohl diese Modifikation in Händen gehabt haben; der Schmelzpunkt des Razemkörpers liegt bei 182°. Nach genannten Forschern ist die Säure erst sekundär aus der Glutaminsäure entstanden.

Auch bei der Razemisierung der d-Glutaminsäure durch Baryt im Autoklaven bei 160—170° entsteht nach E. Fischer, W. Kropp und A. Stahlschmidt[19]) Pyrrolidoncarbonsäure in reichlicher Menge.

Von 1910 ab datieren endlich die Arbeiten von Emil Abderhalden und seinen Mitarbeitern, die sich eingehender mit der Pyrrolidoncarbonsäure befassen.

Der hauptsächliche Fortschritt lag darin, daß zu den weiteren Arbeiten nicht die Säure selbst, sondern das leicht zugängliche Chlorid als Ausgangsmaterial benutzt wurde.

Emil Abderhalden und Akikazu Suwa[20]) stellten es zum ersten Male dar aus der Säure durch Einwirkung

von Phosphorpentachlorid in Suspension in Acetylchlorid. Doch wurden erst dann bessere Resultate erzielt, als sie als Chlorierungsmittel das Thionylchlorid verwendeten. Mit dem, allerdings nicht umkristallisierten Reaktionsprodukt wurde dann das Anfangsglied einer Pyrrolidoncarbonsäure enthaltenden Dipeptidreihe dargestellt, das Pyrrolidonyl-Glycin. Sie liessen Pyrrolidonylchlorid auf Glykokollester einwirken und verseiften den Dipeptidester mit Natronlauge. Es war beabsichtigt, durch Aufspaltung des Ringes nunmehr zu einem Monoglycinderivat der Glutaminsäure zu gelangen, doch stellte sich heraus, daß der Ring fester war als die Säureamidbindung zwischen den beiden Komponenten.

Noch genauere Kenntnis der Pyrrolidoncarbonsäure haben uns die Arbeiten von E. Abderhalden und Karl Kautzsch[21]) vermittelt. Sie stellten eine grössere Anzahl von Salzen dar und versuchten auch Trennungsmethoden für Glutaminsäure-Pyrrolidoncarbonsäure-Gemische auszuarbeiten, die eine Entscheidung der Frage nach dem primären Vorkommen letzterer Verbindung im Eiweiss ermöglichen sollten. Die Trennung gelang nahezu quantitativ unter Benutzung der Siegfried'schen Carbaminsäure-Reaktion, die nur von der Glutaminsäure, nicht aber von der Pyrrolidoncarbonsäure, die ja keine Aminogruppe besitzt, gegeben wird.

Meine Aufgabe war es nun, vom Pyrrolidonylchlorid ausgehend, einige charakteristische Derivate der Säure darzustellen.

Zunächst gelang es mir, Ester der Pyrrolidoncarbonsäure, dabei von der Säure selbst ausgehend, zu erhalten. Das Chlorid reagiert nämlich ziemlich glatt mit Alkoholen unter Abspaltung von Salzsäure. Ich stellte auf diesem Wege den Methyl- und den Aethylester dar und konnte beide durch Vergleichung der Schmelz- und Siedepunkte mit den von Fischer und Böhner aus den entsprechenden Glutaminsäureestern erhaltenen identifizieren.

Als Ester eines komplizierten Alkohols kann man auch das Pyrrolidonyl-Cholesterin bezeichnen, das ich durch Erwärmen des Chlorides mit Cholesterin in Chloroform erhielt. Allerdings verläuft die Reaktion recht wenig glatt; das Kupplungsprodukt entsteht nur in minimaler Ausbeute. Es zeigt, wie sehr viele Cholesterinderivate (vgl. die Arbeiten von Vorländer und Lehmann), das Phänomen des doppelten Schmelzpunktes, da es bei 203° zu einer trüben Masse zusammensinkt, um dann 2° höher plötzlich klar zu schmelzen.

Ich habe dann noch das Chlorid mit d-Alaninester und dl-Leucinester gekuppelt. Beide Reaktionen verliefen ziemlich gut und die Kupplungsprodukte kristallisierten recht schön. Auffallend war die enorme spezifische Drehung des dl-Pyrrolidonyl-d-Alaninesters. Die Hauptschwierigkeiten bei der Darstellung bot das schlechte Kristallisationsvermögen der bei der Reaktion entstehenden Esterhydrochloride, die daher in Lösung bleiben und auf umständliche Weise entfernt werden müssen. Besonders beim Alaninester tritt außerdem ein Nebenprodukt auf (vielleicht Glutaminsäurederivate), welches die Kristallisation und Reindarstellung des Hauptproduktes sehr stört.

Es war beabsichtigt, aus den Dipeptidestern durch Verseifung mit Natronlauge die freien Dipeptide selbst darzustellen. Dies erwies sich aber leider als unmöglich, da mit zunehmender Länge der Seitenkette die Festigkeit des Pyrrolidonringes sehr abnimmt und man daher stets Gemische von Pyrrolidoncarbonsäure- und Glutaminsäurederivaten erhält, deren Trennung bisher nicht geglückt ist.

Die leichtere Aufspaltbarkeit des Ringes ließ sich daran erkennen, daß die analysenreinen Dipeptidester bei der Aminostickstoffbestimmung nach van Slyke[22]) stets beträchtliche Stickstoffmengen ergaben, während Pyrrolidoncarbonsäure selbst, wie vorauszusetzen, nicht in Reaktion tritt. Ausgeschlossen ist jedenfalls, daß bei der Analyse

eine Spaltung des Körpers in seine beiden Komponenten erfolgt sein könnte (etwa durch die vorhandene Essigsäure), da, wie zahlreiche Versuche beweisen, Dipeptide unter den gewählten Versuchsbedingungen keine Spaltung erleiden.

Doch ist anzunehmen, daß es gelingen wird, mit Hilfe besserer Verseifungsmethoden zu den freien Dipeptiden zu gelangen.

Zum Schluß seien auf der umstehenden Tabelle die Eigenschaften der dargestellten Verbindungen, und die Schmelzpunkte (korr.), spezifischen Drehungen und die Löslichkeitsverhältnisse angegeben.

	Schmelzpunkt (korr.)	Spez. Drehung (in Wasser)	Löslichkeit in									Kristallform
			Wasser	Methyl-Alkohol	Aethyl-Alkohol	Chloroform	Aceton	Essigester	Benzol	Aether	Petroläther	
Formyl-dl-Aminobuttersäure	153°	—	kalt 1:3 heiss 1:1	ll.	ll.	ul.	sl.	ul.	sl.	ul.	ul.	Blättchen (Wasser) Nadeln (Alkohol)
Formyl-d-Aminobuttersäure	126°	−27,74°	ll. unter Zers.	ll.	ll.	ul.	sl.	—	ul.	ul.	ul.	Schuppen (Alkohol)
Formyl-l-Aminobuttersäure...	126°	+27,98°	ll. unter Zers.	ll.	ll.	ul.	sl.	—	ul.	ul.	ul.	Schuppen (Alkohol)
dl-Pyrrolidonyl-d-Alaninester.	125°	−46,42°	ll.	ll.	sll.	sl.	l.	sl.	l.	sl.	ul.	Nadeln, zu Rosetten angeordnet (Chloroform + Petroläther)
dl-Pyrrolidonyl-dl-Leucinester	115-117°	—	ll.	ll.	ll.	l.	l.	kalt sl. heiss ll.	—	ul.	ul.	mikrosk. Prismen (aus Essigäther)
dl-Pyrrolidonyl-Cholesterin ..	203° u. 205°	—	ul.	kalt sl. heiss l.	kalt sl. heiss ll.	sll.	—	—	—	l.	ul.	verfilzte Nadeln (Alkohol)

ul. = unlöslich, sl. = schwer löslich, zl. = ziemlich leicht löslich, l. = löslich, ll. = leicht löslich, sll. = sehr leicht löslich.

Experimenteller Teil.

I. Ueber Aminobuttersäure.

A. Darstellung der α-Aminobuttersäure.

Die zu meinen Versuchen nötige Aminobuttersäure habe ich nach den Vorschriften der im theoretischen Teil angegebenen Arbeit von Fischer und Mouneyrat dargestellt. Ich will hier nur die von mir angewandten Modifikationen der Methode besonders angeben.

1. Brombuttersäure.

$CH_3.CH_2.CHBr.COOH.$

Als Ausgangsmaterial diente die normale Buttersäure II von Kahlbaum. Sie wurde mit Brom „Kahlbaum" unter Verwendung von rotem Phosphor als Halogenüberträger bromiert. Auf 250 g Säure verwandte ich 880 g Brom und 35 g Phosphor. Die Säure wurde im Wasserbad auf ca. 40° vorgewärmt und dann das Brom ohne weitere Erwärmung im Laufe von etwa 4 Stunden zutropfen gelassen. Zum Schluß wurde die Flüssigkeit bis zum Aufhören der Bromwasserstoffentwicklung auf 80—90° erhitzt. Diese Maßnahme verbesserte die Ausbeute wesentlich. Das nur hellgelb gefärbte Bromid wurde durch 1 l heisses Wasser zersetzt und nach dem Erkalten die Brombuttersäure mit etwa 2 l Aether extrahiert. Der Aether wurde mit geglühtem Magnesiumsulfat scharf getrocknet, abdestilliert und der Rückstand im Vacuum fraktioniert. Die Brombuttersäure ging bei 11 mm Druck zwischen 112 und 113° über. Die Ausbeute betrug 400 g = 80 %.

2. Aminobuttersäure.

$CH_3.CH_2.CHNH_2.COOH$.

Wichtig ist hier die gute Kühlung beim Auflösen der Brombuttersäure im Ammoniak. Ich ließ deshalb die Säure stets aus einem Tropftrichter ganz langsam (300 g in etwa 3 Stunden) in die fünffache Menge 25%igen Ammoniaks eintropfen, das durch eine Kältemischung auf etwa —5° abgekühlt war. Nur so war es möglich, die Entstehung von Oxybuttersäure in größerer Menge zu verhindern. Nach dreitägigem Verweilen im Brutschrank wurde die Aminobuttersäure durch Eindampfen und Fällen mit Alkohol isoliert. Durch Extraktion mit Alkohol im Soxleth wurde sie ohne die beim Umkristallisieren unvermeidlichen Verluste völlig rein gewonnen. Die Ausbeute betrug etwa 60%.

B. Partielle Vergärung der dl-Aminobuttersäure durch lebende Hefe.

10 g dl-α-Aminobuttersäure und 150 g Rohrzucker wurden in 2 l destilliertem Wasser gelöst und dazu 150 g Hefe (Rasse XII des Institutes für Gärungsgewerbe in Berlin) gegeben.

Die Flüssigkeit befand sich in einem großen Rundkolben, der mit einem einfachen Gärverschluß versehen war. Der Kolben wurde während des Versuches konstant bei 25° gehalten, wobei die Gärung innerhalb 24 Stunden beendet war. Von der Hefe, die sich gut absetzte, wurde durch ein Faltenfilter dekantiert. Der Bodensatz ließ sich nach Schütteln mit etwas Tierkohle leicht absaugen. Die opalescierende Flüssigkeit wurde nun nach der Vorschrift von Rona und Michaelis enteiweißt, wozu etwa 140 ccm kolloidale Eisenhydroxydlösung und 1 g Magnesiumsulfalt verbraucht wurden. Vom Eisenhydroxyd wurde durch ein Faltenfilter abfiltriert und die klare Lösung erst auf dem Wasserbad und zum Schluß im Vacuum möglichst stark eingedampft.

Da der Syrup nicht zur Kristallisation zu bringen war, wurde er zweimal mit Alkohol und Salzsäure verestert und die Flüssigkeit wieder zur Trockne verdampft. Den Rück-

stand löste ich in etwas frischem Alkohol, überschichtete ihn mit absolutem Aether und leitete unter starker Kühlung Ammoniak bis zur Sättigung ein. Vom Ammoniumchlorid wurde abgesaugt und die ätherische Lösung im Vacuum fraktioniert. Der Ester ging bei 30 mm Druck bei 75° über. Er wurde 6 Stunden mit 150 ccm Wasser bis zum Verschwinden der alkalischen Reaktion gekocht. Die Lösung wurde mit Tierkohle entfärbt und auf dem Wasserbad stark eingeengt. Beim Versetzen mit absolutem Alkohol fielen 2,6 g Aminobuttersäure aus, die aus Wasser und Alkohol umkristallisiert wurden. Der Schmelzpunkt war 298° (korr.). 0,1802 g Substanz. Verbraucht 17,40 ccm $^1/_{10}$-n-Schwefelsäure.

Berechnet für $C_4H_9NO_2$: N = 13,6%
Gefunden: N = 13,53%

0,3149 g Substanz wurden in Wasser gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 9,9512 g. Spez. Gew. 1,01. Drehung im 1-dm-Rohr bei Natriumlicht 0,14° nach links.

$[\alpha]_D^{20}$ = —4,41°.

Die Substanz wurde nunmehr aus Wasser fraktioniert kristallisiert. Ich erhielt drei Fraktionen, deren Drehung folgende waren:

(Gelöst wurde stets in Wasser und die Drehung im 1-dm-Rohr bei Natriumlicht bestimmt.)

I. Fraktion:

0,5305 g Substanz. Gesamtgewicht der Lösung 11,1428 g. Spez. Gew. 1,014.
Abgelesener Winkel: —0,15.

$[\alpha]_D^{20}$ = —3,11°.

II. Fraktion:

0,7488 g Substanz. Gesamtgewicht der Lösung: 9,3694 g. Spez. Gew. 1,02.
Abgelesener Winkel: —0,26.

$[\alpha]_D^{20}$ = —3,19°.

III. Fraktion:

0,2796 g Substanz. Gesamtgewicht der Lösung: 10,1106 g. Spez. Gew. 1,008.

Abgelesener Winkel: —0,14.

$[\alpha]_D^{20} = -5{,}03^0$.

Da, wie weiter unten angegeben ist, die spezifische Drehung der l-Aminobuttersäure —7,86° ist, so ergibt sich, daß die Spaltung keine vollständige war. Trotzdem ist der Schluß berechtigt, daß die d-Aminobuttersäure für Fermente leichter angreifbar ist, daher wohl als die eventl. natürlich vorkommende Komponente bezeichnet werden muß.

C. Fütterungsversuche am Kaninchen.

1. dl-Aminobuttersäure.

5 g dl-Aminobuttersäure wurden in 20 ccm Wasser gelöst und mittelst einer Schlundsonde einem Kaninchen verabreicht. Der Harn von zwei Tagen (250 ccm) wurde gesammelt und mit 50 ccm Bleiessig von den Phosphaten befreit. Das Filtrat wurde mit Schwefelwasserstoff entbleit, dieser im Filtrat durch Luft vertrieben und die Lösung im Vacuum zur Trockne verdampft. Der Rückstand wurde zweimal verestert, der Ester mit Ammoniak in Freiheit gesetzt und destilliert. Das Destillat, welches hauptsächlich aus Alkohol bestand, drehte im 0,2-dm-Rohr 0,1° nach links. Die Lösung wurde verseift, mit Tierkohle entfärbt und stark eingeengt. Beim Kochen mit Kupferoxyd färbte die Flüssigkeit sich blau und schied beim Erkalten eine sehr geringe Menge bläulicher Kristalle ab, die offenbar das Kupfersalz der Aminobuttersäure darstellen, aber zur Identifizierung zu wenig waren.

2. dl-Aminobutyryl-Glycin.

Auch hier zeigte sich die außerordentlich leichte Oxydierbarkeit der Aminobuttersäure.

7 g dl-Aminobutyryl-Glycin wurden, in 40 ccm Wasser gelöst, einem Kaninchen mittelst der Schlundsonde eingegeben.

Der Harn von drei Tagen wurde mit Bleiessig gefällt, mit Schwefelwasserstoff entbleit und das Filtrat eingeengt.

Der Kot wurde mit Wasser ausgekocht, abfiltriert und mit kolloidalem Eisenhydroxyd von Kolloiden befreit. Weder im Harn noch im Kotextrakt ließen sich durch Kochen mit Kupferoxyd die geringsten Spuren von Aminosäuren nachweisen.

D. Verhalten der α-Aminobuttersäure gegen rauchende Salzsäure.

Bei diesen Versuchen wurde stets so vorgegangen, daß 1 g (genau abgewogen) dl-Aminobuttersuäre mit rauchender Salzsäure sechs Stunden lang unter Rückfluss gekocht wurden. Dann wurde die Flüssigkeit unter vermindertem Druck zur Trockne verdampft, der Rückstand in Wasser gelöst und genau auf 100 ccm aufgefüllt. In 25 ccm wurde dann das gebildete Ammoniak dadurch bestimmt, daß es mit Natronlauge in vorgelegte $^1/_{10}$-n-Schwefelsäure überdestilliert und die überschüssige Säure mit $^1/_{10}$-n-Natronlauge zurücktitriert wurde. Als Indikator diente immer das Natriumsalz der Alizarinsulfosäure.

Aminobuttersäure selbst spaltete, wie ich durch Versuche feststellte, bei der Destillation mit Natronlauge keinen Stickstoff ab.

I. 1 g Aminobuttersäure und 5 ccm konzentrierte Salzsäure. Verbraucht 1,06 ccm $^1/_{10}$-n-Schwefelsäure. Daraus ergibt sich der Ammoniakstickstoff gleich 4,37 % des Gesamtstickstoffs.

II. 1 g Aminobuttersäure und 10 ccm konzentrierte Salzsäure. Verbraucht 1,30 ccm $^1/_{10}$-n-Schwefelsäure. Ammoniakstickstoff gleich 5,36 % des Gesamtstickstoffs.

III. 1 g Aminobuttersäure und 60 ccm konzentrierte Salzsäure. Dieser Menge lag die Annahme zu Grunde, daß die Aminobuttersäure zu 5 % in einem Protein vorhanden sei. Dann sind 60 ccm die übliche (dreifache) Menge der zur Hydrolyse anzuwendenden Säure. Verbraucht 3,1 ccm $^1/_{10}$-n-Schwefelsäure. Ammoniakstickstoff gleich 12,81 % des Gesamtstickstoffs.

Ich habe in gleicher Weise auch Alanin und Leucin untersucht und gefunden, daß beide Aminosäuren gegen konzentrierte Salzsäure völlig beständig sind, also kein Ammoniak abspalten.

Endlich wurde eine Lösung von 1 g Aminobuttersäure in 60 ccm absolutem Alkohol mit Salzsäuregas gesättigt. Die Flüssigkeit wurde zur Trockne verdampft, der Rückstand in Wasser gelöst, die Lösung auf 100 ccm aufgefüllt und das Ammoniak bestimmt.

Verbraucht wurden 2,20 ccm $^1/_{10}$-n-Schwefelsäure. Ammoniakstickstoff gleich 2,27% des Gesamtstickstoffs.

E. Spaltung der dl-α-Aminobuttersäure in die optisch aktiven Komponenten mittelst der Formylverbindung.

1. Formyl-dl-α-Aminobuttersäure.

$CH_3.CH_2.CH.NH(COH).COOH.$

100 g dl-Aminobuttersäure werden mit 150 g wasserfreier Ameisensäure übergossen und drei Stunden unter Ausschluß von Feuchtigkeit auf dem Wasserbad erhitzt. Dann wird die Ameisensäure im Vacuum möglichst vollständig verdampft, um das gebildete Wasser zu entfernen, und der ganze Prozeß noch zweimal wiederholt. Dabei erstarrt das Reaktionsprodukt kristallinisch. Die Ausbeute wurde wesentlich verbessert, wenn das nur wenig gefärbte Rohprodukt nunmehr bis zum Verschwinden des Ameisensäuregeruches über Schwefelsäure und festem Natriumhydroxyd im Vacuumexsiccator scharf getrocknet wurde. Dies dauerte etwa drei Tage. Dann wurde die rohe Formylaminobuttersäure fein gepulvert und schnell mit 50 ccm n-Salzsäure verrieben. Die Kristalle wurden abgesaugt und mit wenig Eiswasser bis zum Verschwinden der Chlorreaktion gewaschen. Hierbei geht ziemlich viel verloren, doch ist diese Operation notwendig, um die unveränderte Aminobuttersäure zu entfernen. Jetzt war die Substanz schon fast rein, da der Schmelzpunkt sich beim Umkristallisieren kaum noch änderte. Die Ausbeute betrug 87 g = 68,5%.

Aus den Mutterlaugen ließ sich die unveränderte Aminobuttersäure durch Kochen mit Bleioxyd (zum Entfernen der Salzsäure), Entbleien mit Schwefelwasserstoff und Eindampfen zum größten Teil wiedergewinnen.

Zur Analyse wurde die Formylverbindung aus Wasser umkristallisiert und bei 80° im Vacuumtrockenapparat getrocknet.

0,1674 g Substanz gaben 0,2807 g CO_2 und 0,1041 g H_2O.
0,1632 g Substanz. Verbraucht 12,55 ccm $^1/_{10}$-n-Schwefelsäure.
Berechnet für $C_5H_9NO_3$: C = 45,77%, H = 6,92%, N = 10,7%
Gefunden: C = 45,73%, H = 6,96%, N = 10,77%.

Die Formyl-dl-α-Aminobuttersäure kristallisiert aus Wasser in Blättchen, aus Aethylalkohol in mikroskopischen Nädelchen. Smp.: 153° (korr.).

Die Verbindung löst sich in 3 Teilen kaltem Wasser, in heißem Wasser etwa zu gleichen Teilen. Sie ist leicht löslich in Methyl- und Aethylalkohol, schwer löslich in Aceton und Benzol, unlöslich in Chloroform, Essigester, Petroläther und Aether.

Bei längerem Kochen mit Wasser wird die Formylgruppe zum Teil abgespalten. Ich löste 1 g Formyl-Aminobuttersäure in Wasser und leitete 2 Stunden lang Wasserdampf hindurch. Das Destillat reagierte ziemlich stark sauer. Die wässerige Lösung wurde stark eingeengt und mit Alkohol versetzt. Dabei fielen 0,5 g reine Aminobuttersäure aus.
0,2148 g Substanz. Verbraucht 20,65 ccm $^1/_{10}$-n-Schwefelsäure.
Berechnet für $C_4H_9NO_2$: N = 13,6%
Gefunden: N = 13,47%.

2. Formyl-d-Aminobuttersäure.

Die Trennung der beiden Komponenten gelingt leicht mit Hilfe der Brucinsalze.

40 g Formyl-dl-Aminobuttersäure und 120 g wasserfreies Brucin (1 Mol) werden in 2 l absolutem Alkohol gelöst. Nach kurzem Stehen und besonders beim Reiben fallen weiße Kristalle aus, die nach einiger Zeit abgesaugt und mit kaltem Alkohol gewaschen werden. Ihre Menge beträgt

etwa 80 g. Die Mutterlauge wird im Vacuum zur Trockne verdampft, der Rückstand in 160 ccm Wasser gelöst und mit 153 ccm-Natronlauge das Brucin gefällt. Nach 10 Minuten langem Stehen in Eis wird das Brucin abgesaugt, mit Wasser gut ausgewaschen und die Lösung durch erschöpfendes Extrahieren mit Chloroform und Aether von den letzten Spuren Brucin befreit. Die wässerige Lösung wird mit n-Salzsäure genau neutralisiert und im Vacuum bei einer 35° nicht übersteigenden Temperatur verdampft. Die Formyl-d-Aminobuttersäure wird durch Auskochen mit absolutem Alkohol vom Kochsalz getrennt. Jetzt wird wiederum zur Trockne verdampft. Zur Verarbeitung auf freie d-Aminobuttersäure ist es nicht nötig, den aktiven Formylkörper in reinem Zustande zu isolieren, da dies große Schwierigkeiten macht. Er verliert nämlich schon bei längerem Stehen mit kaltem Wasser zum Teil Ameisensäure. Zur Feststellung seiner Eigenschaften habe ich das Rohprodukt zweimal mit wasserfreier Ameisensäure erhitzt und dies wiederum abdestilliert. Um die letzten Spuren Kochsalz zu entfernen, verrieb ich ihn mit Alkohol, dem ich mit geglühtem Kupfersulfat das Wasser entzogen hatte. Da der aktive Formylkörper auch in Alkohol spielend löslich ist, mußte ich diesen wiederum völlig verdampfen, was zur Vermeidung einer eventuellen Alkoholyse bei gewöhnlicher Temperatur stattfinden mußte.

Die Formyl-d-Aminobuttersäure ist in kaltem Wasser, Methyl- und Aetylalkohol sehr leicht löslich, sie löst sich kaum in Aceton; in Chloroform, Aether und Petroläther ist sie unlöslich.

Aus Alkohol gewinnt man sie in unregelmäßigen Schuppen. Beim Erhitzen im offenen Kapillarrohr schäumt sie ohne zu schmelzen von 125° an unter vollständiger Abspaltung der Formylgruppe (offenbar als Kohlenoxyd). Ein Schmelzen unter Verfärbung findet erst bei 304°, dem Schmelzpunkt der d-Aminobuttersäure statt. Im geschlossenen

Kapillarrohr wird die Verbindung schon gegen 100° weich, schmilzt aber erst bei 126° (korr.).

10,27 mg Substanz geben 17,12 mg CO_2 und 6,78 mg H_2O.

9,38 mg Substanz geben 0,923 ccm Stickstoff bei 710 mm Druck und 20°.

(Mikroanalyse nach Pregl).

Berechnet auf $C_5H_9NO_3$: C = 45,77%, H = 6,92%, N = 10,7%

Gefunden: C = 45,47%, H = 7,39%, N = 10,7%

0,3232 g Substanz in Wasser gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 7,5102 g.

Spez. Gew. 1,022. Drehung bei Natriumlicht im 1-dm-Rohr 1,22° nach links.

$[\alpha]_D^{20} = -27{,}74°$

3. d-Aminobuttersäure.

Wie oben bereits angegeben, ist für die Gewinnung der freien Säure die Reindarstellung des Formylkörpers nicht nötig. Daher werden die alkoholischen Extrakte, die den aktiven Formylkörper unrein enthalten, direkt weiter verarbeitet. Zu diesem Zweck wird durch die Lösung 4—5 Stunden lang ein kräftiger Wasserdampfstrom geleitet. Nach dieser Zeit ist die Abspaltung der Ameisensäure fast vollständig. Die Lösung wird eingedampft, mit Alkohol gefällt und die d-Aminobuttersäure aus Wasser und Alkohol umkristallisiert. Die Ausbeute betrug 12 g = 70% der Theorie.

0,5427 g Substanz in Wasser gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 19,3488 g.

Spez. Gew. 1,01. Drehung bei Natriumlicht im 1-dm-Rohr 0,23° nach rechts.

$[\alpha]_D^{20} = +8{,}12°$ (+ 8,0° nach Fischer und Mouneyrat).

4. Formyl-l-Aminobuttersäure.

Die Gewinnung dieser Verbindung erfolgte aus den bei der Spaltung abgeschiedenen Kristallen in der gleichen Weise wie bei der Formyl-d-Aminobuttersäure. Löslichkeit,

Zersetzlichkeit durch Wasser und Schmelzpunkt stimmen bei beiden Körpern genau überein.

0,1300 g Substanz geben 0,2193 g CO_2 und 0,0770 g H_2O.

0,1137 g Substanz. Verbraucht 8,7 ccm $^1/_{10}$-n-Schwefelsäure.

Berechnet auf $C_5H_9NO_3$: C = 45,77%, H = 6,92%, N = 10,7%.

Gefunden: C = 46,01%, H = 6,62%, N = 10,72%.

0,3230 g Substanz in Wasser gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 7,0940 g.

Spez. Gew. 1,023°. Drehung im 1-dm-Rohr bei Natriumlicht 1,30° nach rechts.

$[\alpha]_D^{20} = +27{,}98°$.

5. l-Aminobuttersäure.

Auch hier wurde die freie Säure direkt aus den alkoholischen Auszügen isoliert, in genau derselben Weise wie die d-Aminobuttersäure.

0,5952 g Substanz in Wasser gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 13,1246 g.

Spez. Gew. 1,01. Drehung im 1-dm-Rohr bei Natriumlicht 0,36 nach links.

$[\alpha]_D^{20} = -7{,}86°$ (—7,92° bei Fischer und Mouneyrat.)

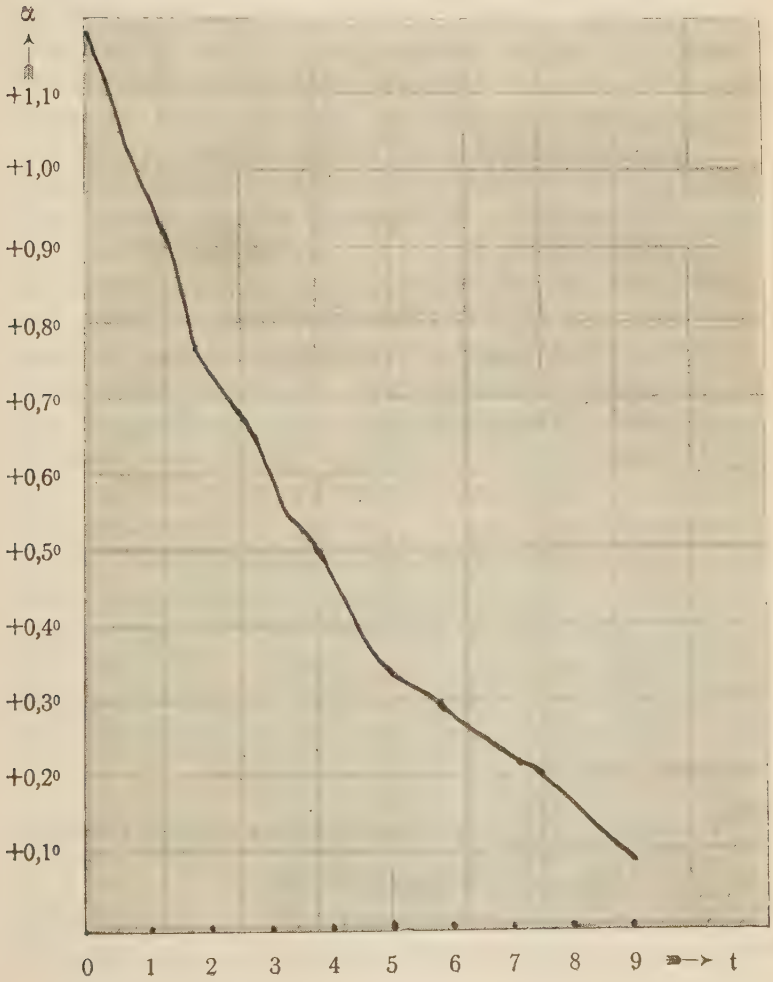
6. Optische Verfolgung der Abspaltung der Formylgruppe aus der Formyl-l-Aminobuttersäure.

8 g reine Formyl-l-Aminobuttersäure wurden in 200 ccm Wasser gelöst. Das Lösungsmittel wurde kontinuierlich abdestilliert, gleichzeitig aber durch Zutropfen von frischem Wasser immer wieder ergänzt. Von Zeit zu Zeit wurde eine Probe herausgenommen und die Drehung festgestellt.

Wie die Tabelle, und noch besser die beigefügte Kurve zeigt, nahm die Drehung in gleichen Zeiten nicht

um gleiche Beträge ab, sondern folgte ungefähr dem Massenwirkungsgesetz.

Anfangsdrehung:	+ 1,18°	Nach 3¼ Stunde:	+ 0,57°
Nach ½ Stunde:	+ 1,05°	„ 3¾ „	+ 0,50°
„ 1¼ „	+ 0,92°	„ 4¾ „	+ 0,35°
„ 1¾ „	+ 0,77°	„ 5¾ „	+ 0,29°
„ 2¼ „	+ 0,70°	„ 7¼ „	+ 0,21°
„ 2¾ „	+ 0,65°	„ 9 „	+ 0,09°



II. Derivate der Pyrrolidoncarbonsäure.

A. Darstellung der dl-Pyrrolidoncarbonsäure.

Als Ausgangsmaterial verwandte ich reine, umkristallisierte Glutaminsäure aus Weizengliadin. Sie wurde in einem weithalsigen Rundkolben im Oelbad auf 180° erhitzt und dann noch etwa 1 Stunde bis 190°. Die hellbraune Schmelze wurde noch heiß in wenig Wasser gelöst und mit Tierkohle entfärbt. Beim Erkalten kristallisierte die Pyrrolidoncarbonsäure in weißen, schönen Kristallen, die bei 100° getrocknet wurden. Sie zeigten sogleich den richtigen Schmelzpunkt 181—182°. Aus der Mutterlauge ließ sich noch reine Säure gewinnen, wenn ich das Wasser möglichst völlig verdampfte und den Syrup schnell auf ca. 200° erhitzte. Durch Umkristallisieren aus Wasser erhielt ich dann reichliche Mengen völlig inaktiver Säure. Die Ausbeute betrug meist 80—85% der Theorie.

B. Pyrrolidonylchlorid.

20 g feinpulverisierte Pyrrolidoncarbonsäure erwärmte ich mit ca. 70 g Thionylchlorid auf 55—60°. Das ganze befand sich in einem Kölbchen, das mit Steigrohr und Chlorcalciumrohr versehen war. Wenn die Salzsäureentwicklung nachgelassen hatte, wurde schnell auf vorgewärmtem Trichter durch Glaswolle in einen Erlenmeyerkolben filtriert, der in einem Vacuumexsiccator stand. Dieser wurde evacuiert und mehrere Stunden stehen gelassen, wobei das Pyrrolidonylchlorid auskristallisierte. Es wurde dann schnell abgesaugt und mit trockenem Chloroform ausgewaschen. Zum Schluß wurde es im Vacuumexsiccator über Schwefelsäure und Natriumhydroxyd getrocknet. Die Ausbeute betrug 18 g = 87,5% der Theorie.

C. Verhalten des Pyrrolidonylchlorids gegen Alkohole.

1. Methylalkohol.

7 g Pyrrolidonylchlorid wurden in 50 ccm Methylalkohol, der durch geglühtes Kupfersulfat völlig entwässert

war, gegeben. Das Chlorid löste sich unter schwacher Erwärmung klar auf. Der Methylalkohol wurde nun unter vermindertem Druck abdestilliert. Im Destillat waren reichliche Mengen Salzsäure nachzuweisen. Der Rückstand wurde unter vermindertem Druck fraktioniert, wobei die Hauptmenge bei 25 mm Druck und 180° überging. Der Siedepunkt blieb auch bei einer zweiten Destillation unverändert. Das Produkt kristallisierte nicht und zeigte auch die gleichen Löslichkeitsverhältnisse wie der von Fischer und Boehner dargestellte Pyrrolidoncarbonsäure - Methylester. Erhalten wurden 4,5 g = 67% der Theorie.

2. Aethylalkohol.

Hier verfuhr ich in der gleichen Weise wie beim Methylalkohol. 6 g Pyrrolidonylchlorid wurden in etwa 50 ccm absolutem Alkohol gelöst und dieser sogleich abdestilliert. Das Reaktionsprodukt wurde dann bei 12 mm Druck fraktioniert, wobei die Hauptmenge bei 184°, dem Siedepunkte des Pyrrolidoncarbonsäureäthylesters, überging. Das Destillat erstarrte beim Abkühlen in der Vorlage kristallinisch. Es wurde aus sehr wenig Alkohol und viel Aether umkristallisiert. Der Ester erweichte beim Erhitzen bei 45° und schmolz bei 52—53°. Die Ausbeute betrug 70° der Theorie.

D. Pyrrolidonyl-Cholesterin.

Bei den folgenden Versuchen war es von größter Wichtigkeit, jede Spur von Feuchtigkeit auszuschließen. Deshalb wurde das Cholesterin unmittelbar vor dem Versuch 5 Stunden lang bei 100° im Vacuum getrocknet. Das Chloroform befand sich über oft erneuertem Posphorpentoxyd.

5,4 g Cholesterin (etwas mehr als ein Mol) wurden in etwa 150 ccm trockenem Chloroform gelöst und dazu 2 g Pyrrolidonylchlorid gegeben. Dann wurde 1/2 Stunde in einem Wasserbad von 65° das Chloroform zum schwachen Sieden erhitzt. Auf den Kolben war ein Rückflußkühler mit Chlorcalciumrohr aufgesetzt. Die Reaktion ging unter starker

Salzsäureentwicklung vor sich. Als sie fast aufgehört hatte, wurde die Lösung von geringen harzigen Mengen abfiltriert und im Vacuum stark eingeengt. Beim Versetzen mit Petroläther und längerem Stehen in einer Kältemischung fiel das Pyrrolidonylcholesterin kristallinisch aus; es wurde abgesaugt und mit Petroläther gewaschen. Nach dem Auflösen in heißem Aethylalkohol unter Anwendung von Tierkohle fiel es beim Abkühlen der Lösung in weißen verfilzten Nädelchen aus, wurde abgesaugt und bei 100° getrocknet.

Der Schmelzpunkt auch der reinen Substanz ist nicht völlig scharf. Von 199—203° nämlich sintert die Substanz zu einem dicken, trüben Oeltropfen, der dann bei 205° plötzlich klar wird. Die Substanz löst sich leicht in Chloroform, ziemlich leicht in Aether; in Methyl- und Aethylalkohol ist sie in der Kälte sehr schwer, in der Wärme bedeutend leichter löslich; in Petroläther und Wasser ist sie unlöslich.

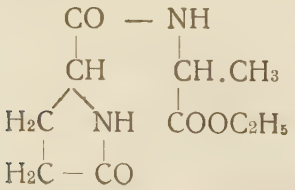
Die Ausbeute betrug nur 0,6 g. Die Mutterlauge wurde eingedampft, in Chloroform gelöst und mit Methylalkohol versetzt. Dabei ergab sich eine starke Kristallabscheidung, die aber, wie der Schmelzpunkt (146°) zeigte, aus unverändertem Cholesterin bestand.

Zur Analyse wurde bei 100° im Vacuum getrocknet. 0,1296 g Substanz gaben 0,3637 g CO^2 und 0,1205 g H_2O. 0,1956 g Substanz gaben 5,0 ccm Stickstoff von 16° u. 762 mm Druck. Auf $C_{31}H_{49}NO_3$ berechnet:

C = 76,95%, H = 10,17%, N = 2,90%.

Gefunden: C = 76,53%, H = 10,40%, N = 3,02%.

E. Pyrrolidonyl-d-Alaninester.



Zu 15 g d-Alaninester (2 Mol), der in 200 ccm Chloroform gelöst war, wurden in der Kälte 8,8 g dl-Pyrrolidonylchlorid gegeben. Das Chlorid löste sich beim Schütteln schnell auf. Die braune Lösung blieb ein paar Stunden stehen und wurde dann, da der salzsaure Alaninester nicht ausfiel, im Vacuum möglichst stark eingedampft. Der Rückstand wurde in absolutem Alkohol gelöst und auf genau 100 ccm aufgefüllt. In einem aliquoten Teil wurde das Chlor durch Titration nach Volhard bestimmt und zu dem Rest die berechnete Menge Natrium, in Alkohol gelöst, hinzugefügt. Nach längerem Stehen in Eis wurde ohne Filtration der Alkohol im Vacuum verdampft. Zur Entfernung des Alaninesters wurde der Rückstand noch mehrere Male mit Alkohol abgedampft. Das zurückbleibende Gemisch von Kupplungsprodukt und Kochsalz wurde dann mit Essigester ausgekocht, mit Tierkohle entfärbt, abfiltriert und das eingeengte Filtrat mit Petroläther verrieben. Das dabei in weißen Kristallen ausfallende Reaktionsprodukt wurde abgesaugt und mit Petroläther gewaschen. Aus der Mutterlauge ließ sich durch Eindampfen im Vacuum und Fällen mit Petroläther noch eine ziemlich große Menge eines braunen Oeles gewinnen, das bei längerem Stehen in einer Kältemischung ebenfalls kristallisierte. Beide Fraktionen wurden getrennt in Essigester gelöst, mit Tierkohle gekocht und mit Petroläther wieder abgeschieden. Meist erhielt ich dabei ein farbloses Oel, das aber bald, besonders beim Abkühlen, kristallinisch erstarrte. Die Ausbeute betrug 5 g = 36,7% der Theorie, bezogen auf das angewandte Pyrrolidonylchlorid.

Die Substanz löste sich leicht in Wasser, Methyl- und Aethylalkohol, Chloroform, Aceton, Essigester und Benzol; in Aether und Petroläther ist sie fast unlöslich. Beim Versetzen der Lösung des Esters in Chloroform mit Petroläther fällt er in feinen, zu Rosetten angeordneten Nadeln aus. Smp.: 125,5° (korr.)

Zur Analyse wurde die Substanz nochmals aus Essig-

ester und Petroläther umkristallisiert und im Vacuum bei 80° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

0,1668 g Substanz gaben 0,3201 g CO_2 und 0,1078 g H_2O.
0,1203 g Substanz, Verbraucht 10,4 ccm $^1/_{10}$-n-Schwefelsäure.
Auf $C_{10}H_{16}N_2O_4$ berechnet:

C = 52,59%, H = 7,07%, N = 12,28%.

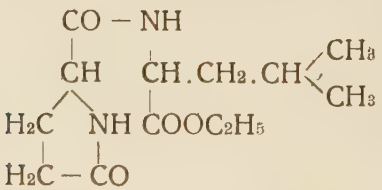
Gefunden: C = 52,34%, H = 7,23%, N = 12,11%.

0,2262 g Substanz in Wasser gelöst und auf 10 ccm aufgefüllt. Drehung bei Natriumlicht im 1-dm-Rohr 1,05° nach links.

$[\alpha]_D^{20} = -46{,}42°$.

0,1 g wurden in 10 ccm Wasser gelöst und in 7,5 ccm der Lösung der eventuelle Aminostickstoff nach van Slyke bestimmt. Die Reaktion wurde 5 Minuten lang fortgesetzt. Es ergaben sich 2,9 ccm Stickstoff von 750 mm Druck und 20° (über Wasser aufgefangen). Daraus berechnen sich 2,16% Aminostickstoff oder 17,84% des Gesamtstickstoffs. Zu ganz ähnlichen Zahlen kam auch bei der analogen Bestimmung beim Pyrrolidonyl-Leucinester, worauf ich hier nur hinweisen möchte.

F. dl-Pyrrolidonyl-dl-Leucinester.



40 g dl-Leucinester wurden in 200 ccm trocknem Chloroform gelöst und 18,5 g Pyrrolidonylchlorid unter guter Kühlung zugesetzt. Das Chlorid löste sich schnell auf. Das Chloroform wurde nach längerem Stehen abdestilliert und der Rückstand zu 250 ccm in absolutem Alkohol gelöst. In einem aliquoten Teil bestimmte ich das Chlor titrimetrisch und fällte es im Rest durch die berechnete Menge Natriumäthylat aus. Der Alkohol wurde im Vacuum stark eingeengt und der Rückstand

mit Petroläther versetzt. Es fiel ein Gemisch von Kochsalz und Pyrrolidonyl-Leucinester aus, das abgesaugt wurde. (I).

Aus der Mutterlauge ließ sich durch Einengen und nochmaliges Versetzen mit Petroläther noch eine beträchtliche Menge des Reaktionsproduktes gewinnen (II). Produkt I wurde mit Essigester unter Zusatz von Tierkohle ausgekocht und vom Kochsalz abfiltriert. Beim Abkühlen fiel der Ester in weißen, mikroskopischen Prismen aus. Das zweite Produkt, ebenfalls aus Essigester umkristallisiert, erwies sich als mit dem ersten Produkt identisch. Aus den Mutterlaugen ließ sich keine gut kristallisierte Substanz mehr gewinnen. Die Ausbeute an reinem Produkt betrug etwa 15 g = 44% der Theorie, bezogen auf das angewandte Pyrrolidonylchlorid.

Die Substanz löst sich spielend leicht in Wasser, Methyl- und Aethylalkohol, leicht in Aceton, Benzol und heißem Essigester; in kaltem Essigester ist sie schwer, in Aether und Petroläther nicht löslich. Aus Essigester kristallisiert sie in kleinen Prismen. Smp.: 115—117° (korr.).

Zur Analyse wurde die Substanz nochmals aus Essigester umkristallisiert und bei 80° im Vacuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

0,1580 Substanz gaben 0,3330 g CO_2 und 0,1162g H_2O.
0,1338 g Substanz, Verbraucht 9,8 ccm $^1/_{10}$-n-Schwefelsäure.
Auf $C_{13}H_{22}N_2O_4$ berechnet:
C = 57,33%, H = 8,21%, N = 10,37%.
Gefunden: C = 57,48%, H = 8,23%, N = 10,26%.

Von diesem Körper habe ich zwei Aminostickstoffbestimmungen an zwei verschiedenen Präparaten gemacht. Bei beiden betrug die Reaktionsdauer 5 Minuten, auch alle anderen Versuchsbedingungen wurden völlig gleich gehalten. Daher kommt auch die große Uebereinstimmung beider Resultate.

I. 0,2224 g zu 10 ccm in Wasser gelöst. Davon 9,46 ccm verwandt. Sie ergaben 11,0 ccm Stickstoff von 21° und 751 mm Druck (über Wasser aufgefangen). Daraus berechnen sich 2,87% Aminostickstoff.

II. 0,1613 g zu 10 ccm in Wasser gelöst. 9,39 ccm verbraucht. Erhalten: 7,3 ccm Stickstoff von 16° und 744 mm Druck (über Wasser) = 2,7% Aminostickstoff. Es werden also bei dieser Methode über 27% des Gesamtstickstoffs abgespalten.

Wahrscheinlich ist, daß das Amin durch Aufspaltung des Pyrrolidonringes entsteht und nicht durch Aufspaltung zwischen den beiden Komponenten.

Literaturnachweis.

1. **Emil Fischer, P. A. Levene** und **R. H. Aders:** Ueber die Hydrolyse des Leims. Zeitschrift für physiologische Chemie. Bd. 35, S. 70, 1902.
2. **Schützenberger** und **Bourgeois:** Comptes rendues, Bd. 82, S. 3263.
3. **R. Schneider:** Ueber Dibrombuttersäure, Dibrompropriонsäure und einen neuen, dem Glykokoll homologen Körper. Annalen der Chemie. Supplement 2, S. 70. 1862-63.
4. **R. Schneider:** Poggendorfs Annalen Bd. 114, S. 267.
5. **N. Zelinsky** und **G. Stadnikoff:** Ein Beitrag zur Synthese des Alanins und der α-Aminobuttersäure. Ber. d. deutschen chem. Ges., Bd. 41, S. 2062. 1908.
6. **Emil Fischer** und **A. Mouneyrat:** Spaltung einiger razemischer Aminosäuren in die optisch aktiven Komponenten IV. Ber. d. deutschen chem. Ges., Bd. 33, S. 2387. 1900.
7. **Emil Fischer:** Synthese von Polypeptiden IX. Chloride der Aminosäuren und ihrer Acyl-Derivate. Ber. d. deutschen chem. Ges., Bd. 38, S. 619. 1905.
8. **Emil Fischer** und **Karl Raske:** Synthese von Polypeptiden XI. Derivate der α-Aminobuttersäure. Liebigs Annalen der Chemie, Bd. 340, S. 180. 1905.
9. **Emil Abderhalden, Hsing Lang Chang** und **Erich Wurm:** Derivate der α-Aminobuttersäure und ihr Verhalten gegenüber peptolytischen Fermenten. Zeitschrift für physiologische Chemie, Bd. 72, S. 24. 1911.
10. **Felix Ehrlich** in Abderhaldens Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden, Bd. II.
11. **E. Friedmann:** Zur Kenntnis des Abbaues der Karbonsäuren im Tierkörper. Beiträge zur Physiologie und Pathologie, Bd. 11, S. 155.
12. **E. Fischer** und **O. Warburg:** Spaltung des Leucins in die optisch aktiven Komponenten mittels der Formylbindung. Ber. d. deutschen chem. Ges., Bd. 38, S. 3997. 1905.

13. **R. Locquin:** Dédoublement de l'acide α-amino-β-méthyl-β-éthyl-propionique en ses deux inverses optiques. I. Bull. soc. chim. (4) 1,595. 1907.

14. **Schützenberger:** Ber. d. deutschen chem. Ges., Bd. 8, S. 643. 1875.

15. **Ludwig Haitinger:** Vorläufige Mitteilung über Glutaminsäure und Pyrrol. Monatshefte für Chemie, Bd. 3, S. 228. 1882.

16. **E. Fischer** und **R. Böhner:** Verwandlung der Glutaminsäure bezw. Pyrrolidoncarbonsäure in Prolin. Ber. d. deutschen chem. Ges., Bd. 44, S. 1332. 1911.

17. **A. Menozzi** und **G. Appiani:** Sopra un nuovo acido derivato dal glutammico, Gazzetta Bd. 22, II, S. 105. 1892; Sopra alcuni derivati dell'acido Glutammico, acidi piroglutammici e piroglutammidi. Gazzetta chimica italiana, Bd. 24, I, S. 370. 1894.

18. **E. Fischer** und **Th. Dörpinghaus:** Hydrolyse des Horns. Zeitschrift für physiologische Chemie, Bd. 36, S. 462. 1902.

19. **E. Fischer, W. Kropp** und **A. Stahlschmidt:** Synthese von Polypeptiden. Derivate der Glutaminsäure. Liebigs Annalen, Bd. 365, S. 181. 1909.

20. **Emil Abderhalden** und **Akikazu Suwa:** Synthese von Polypeptiden. Derivate der Pyrrolidoncarbonsäure. Ber. d. deutschen chem. Ges., Bd. 43, S. 2151. 1910.

21. **Emil Abderhalden** und **Karl Kautzsch:** Beiträge zur Kenntnis der Glutaminsäure und der Pyrrolidoncarbonsäure. Zeitschrift für physiologische Chemie, Bd. 64, S. 447; Bd. 68, S. 487. 1910; Bd. 78, S. 333. 1912.

22. **Donald van Slyke,** in Abderhaldens Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden, Bd. 5, S. 995.

Vita.

Ich, Erich Wurm, bin geboren am 26. Dezember 1889 in Berlin als Sohn des Kaufmanns Albert Wurm und seiner Gattin Selma, geb. Sachs. Ich bin jüdischen Glaubens. Von meinem 9. Jahre an besuchte ich das Dorotheenstädtische Realgymnasium in Berlin, welches ich mit dem Zeugnis der Reife verliess, um mich dem Studium der Naturwissenschaften, insbesondere der Chemie, zu widmen. Ich besuchte die Universitäten in Berlin, Freiburg i./B. und Halle. Im Winter 1909–1910 bestand ich das Verbandsexamen. Seit Oktober 1912 diene ich beim Füsilier-Regiment 36 in Halle. Allen meinen Lehrern sage ich hier meinen herzlichsten Dank; besonders erwähnen möchte ich Fischer, Rubens, Plate, Riehl und Abderhalden.

Vorliegende Arbeit wurde im physiologischen Institute der Königl. Tierärztlichen Hochschule zu Berlin im Sommersemester 1910 begonnen und im physiologischen Institut der Königl. Universität zu Halle a. S. zum Abschluss gebracht.

Herrn Professor Dr. Abderhalden bin ich für sein reges Interesse und seine stetige Unterstützung bei dieser Arbeit zu besonderem Danke verpflichtet.